EFECTO DE LA LUZ LÁSER INFRARROJA PULSADA SOBRE EL CARCINOSARCOMA DE WALKER 256 EN RATAS SPRAGUE DAWLEY/IME

D'Alessandro Martínez, A. J.* Selgrad, S. Sutil Rosas, A. P.*** Hunger, M.******

*Cátedra de Fisiología. Escuela de Medicina Luis Razetti. Instituto de Medicina Experimental. Universidad Central de Venezuela. AP 50587, Cátedra de Fisiología, Oficina 224, Los Chaguaramos, Caracas, Telfax (02) 6053387 / Departamento de Procesos Biológicos. Sección de Biofísica y Bioingeniería. Laboratorio de Biofísica y Electrofisiología. Universidad Simón Bolívar.

**Instituto Nacional de Higiene. Instituto de Medicina Experimental.

***Pasante de la Facultad de Medicina. Escuela Luis Razetti. Universidad Central de Venezuela.

****Facultad de Ciencias. Departamento de Física Universidad Central de Venezuela.

Resumen: Esta investigación tiene por objeto determinar el efecto de la radiación láser infrarroja cercana pulsada sobre el carcinosarcoma de Walker en ratas Sprague Dawley / IME. La radiación utilizada se generó mediante un diodo láser HITACHI (HL83 12G). Se utilizaron 34 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley / IME. La irradiación se realizó en el pabellón de la oreja de cada animal durante 20 minutos 1 día. Se encontró que la radiación utilizada disminuye el volumen tumoral porque el índice tumoral fue superior a la unidad durante todo el experimento (entre 2,5 y 1,4) y el test de Student arrojó una diferencia significativa (p=0,008) entre el grupo enfermo no irradiado y el enfermo irradiado. La sobrevivencia en los animales enfermos irradiados es mayor (80%) cuando se compara con los enfermos no irradiados(37,5%). Adicionalmente, el test de Student indicó una diferencia significativa (p=0,03) en la sobrevivencia de ambos grupos. Además, se observó un ciclo biológico (de 16 días) en el hematocrito de los animales sanos, que se incrementa en los animales enfermos. En estos últimos la media del hematocrito para todo el experimento se reduce en un 6% con respecto a los animales sanos. Se observó que la velocidad de ascenso del hematocrito en los animales enfermos irradiados es mayor (1,12% / día) que en los animales enfermos no irradiados (0,81% / día), sin embargo, el test de Student indicó que la radiación láser IR no tiene influencia estadísticamente significativa sobre el hematocrito.

Palabras clave: Carcinosarcoma de Walker/ Índice tumoral/ Láser IR/ Ratas Sprague Dawley-IME.

I. INTRODUCCIÓN

Esta investigación tiene por objeto determinar el efecto de la radiación láser infrarroja cercana sobre la evolución del carcinosarcoma de Walker en las ratas Sprague Dawley.

El término láser representa las iniciales en inglés de la frase "light amplification by stimulated emission of radiation" y su posibilidad teórica fue planteada por primera vez en 1917, por Einstein [1]. Su realización experimental fue posible en 1960, cuando Maiman (1960) publicó la construcción de un láser de rubí (694,3 nm). El término láser se refiere entonces a radiación electromagnética producida mediante un mecanismo muy específico (emisión estimulada) que ocurre en un determinado material. Dicha radiación posee características muy especiales: gran intensidad, direccionalidad y colimación, coherencia óptica y monocromaticidad [2, 3].

Las longitudes de onda de la radiación láser abarcan la región visible del espectro electromagnético (luz), las regiones ultravioleta, infrarrojo y las microondas (máser). Recientemente, se ha obtenido también el láser de rayos x blandos (100-200Å) [4, 5].

La radiación láser tiene diversas aplicaciones en Medicina, entre ellas se pueden citar sus aplicaciones quirúrgicas [2] fundamentadas en su efecto térmico y su uso en el tratamiento de diversas disfunciones y neoplasias malignas, debido a su efecto fotoquímico y fotobiológico [6, 7].

En la terapia fotodinámica [6, 8, 9, 10] la combinación de un fotosensibilizador (como el psoraleno, la hematoporfirina, el fotofrin II, la merocianina, etc), la luz y el oxígeno produce una reacción fotoquímica en los tejidos cancerosos, produciéndose usualmente su necrosis [11]. El efecto parece localizarse preferencialmente en los vasos sanguíneos del tumor más que en las mismas células tumorales; el mecanismo de la necrosis del tejido parece estar relacionado en parte con la

necrosis de los vasos sanguíneos provocada por la formación de oxígeno singlete, altamente tóxico, quedando indemnes los tejidos sanos [12].

En la laserterapia [13] se inducen cambios fotobiológicos en los factores de crecimiento y/o de necrosis del tumor y/o del sistema inmune, irradiando bien sea a las células tumorales y/o a la sangre.

En el campo de la laserterapia uno de los trabajos más relevantes publicados es el de Karu [7], en el que se demostró que la irradiación con luz roja o azul produce un incremento en el índice mitótico de cultivos celulares. Estos datos indican que la irradiación tiene efectos sobre el metabolismo celular. Además, la irradiación produce efectos de inhibición y letalidad en cultivos de células mamarias y de E. coli.

Tsukerman y cols [14] encontraron que la radiación láser (510 y 633 nm), aplicada intravascularmente a la sangre, produce una marcada actividad antitumoral y particularmente antimetastásica sobre el linfosarcoma en ratas.

II. DESARROLLO

1. Materiales y métodos

El tipo de láser utilizado fue un diodo que emite pulsos de luz láser infrarrojo HITACHI (HL8312G), constituido por Arseniuro de Galio con impurezas de Aluminio (GaAlAs), que emite en un rango de longitudes de onda entre 810 y 850 nm [15, 16], con una potencia de operación de 20 mVatios en régimen permanente y un tiempo de respuesta del dispositivo es menor a 0,5 ns. La fuente y el programador de pulsos se construyeron bajo la dirección del Dr. Manfred Hunger, en el Lab. de Física Molecular del Dpto. de Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y permite la emisión de trenes de pulsos con frecuencia (f_{tren}) variable de 3, 7, 12 y 13 MHz y una duración del pulso (D_p) variable de 20, 70 y 160 ns. En los experimentos utilizamos un tren de pulsos con una frecuencia de 3 MHz, una longitud de onda de 830 nm y una duración del pulso de 70 ns (Fig. 1). Las ratas Sprague Dawley / IME y las células del carcinosarcoma de Walker fueron suministradas por el Dr. Stefan Selgrad, jefe del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la Universidad Central de Venezuela.

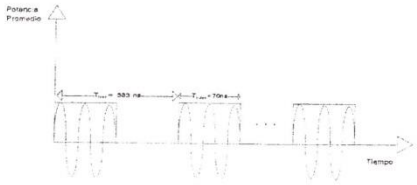

Fig. 1. Programa de pulsos específicos utilizado en los experimentos.

Se utilizaron 34 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley con un peso aproximado entre 200 y 250 g, seleccionadas utilizando una tabla de números aleatorios (TNA) para conformar cuatro grupos: GRUPO CONTROL: 8 animales, sanos sin irradiación; GRUPO I: 8 animales, sanos con irradiación; GRUPO II: 8 animales, enfermos sin irradiación y GRUPO III: 10 animales, enfermos con irradiación.

El tipo de tumor utilizado fue el tumor de Walker, cuyas células tumorales crecieron previamente en la cavidad peritoneal de 2 ratas, para luego ser reinoculadas por vía subcutánea en los animales seleccionados. El número de células tumorales inoculadas por animal fueron aproximadamente 3 millones, contenidas en 0,5 ml de líquido ascitico. La vía de inoculación fue subcutánea en la región sacro-coccígea

La irradiación se realizó en el pabellón de la oreja, debida a su gran vascularización y la delgadez de su piel, comenzando 2 días después de la inoculación durante un tiempo de exposición de 20 minutos diarios. Los parámetros medidos fueron el volumen tumoral, la sobrevida y el hematocrito (a las 9:00 am de cada día de medición).

El valor del hematocrito se midió como una prueba indirecta del estado de salud general del animal y como una evaluación indirecta del desarrollo del volumen tumoral debido a que Selgrad [17] comprobó que las ratas portadoras del tumor de Walker desarrollan un cuadro anémico e hipóxico severo que acelera la muerte de estos animales

Los resultados fueron analizados utilizando el test de Student (t).

2. Resultados

Al analizar la dinámica del crecimiento tumoral (volumen vs tiempo) (Fig. 2) se observa que en el séptimo día de la irradiación (momento en el cual el tumor se hace medible), el volumen del tumor del grupo de animales no irradiados (grupo II) fue de 11 cm^3, mientras que el volumen del tumor en los animales irradiados (grupo 111) fue de 7 cc. Para el grupo II el

volumen del tumor alcanzó su máximo en el día 16 con un valor de 38 cc y para el grupo III el máximo se alcanzó en el día 12 con un valor de 21 cc. En este último grupo el volumen del tumor presenta una meseta entre los días 12 y 18 con un valor promedio aproximado de 21 cc. En este mismo lapso el grupo no irradiado (grupo II) presenta una fase de crecimiento con una pendiente de 2,2 cc / día, seguida de otra de decrecimiento con una pendiente de 3,3 cc / día. La evolución temporal del índice tumoral (determinado como el cociente del volumen tumoral promedio del grupo II entre el del grupo III en cada día de medición), se mantiene durante todo el experimento con un valor, superior a la unidad, presentando un valor máximo de 2,5 en el segundo día de medición y un valor mínimo de 1,4 al final del experimento. La media del volumen tumoral para todo el experimento fue de 28 cc para el grupo U y de 16 cc para el grupo TU (ver Tabla I). El cociente entre ambos valores es de 1,8. El test de Student demostró que existen diferencias estadísticamente significativas (p=0,008) entre el grupo II y el grupo III en el volumen del tumor. De acuerdo con estos resultados se puede concluir que la radiación láser infrarroja cercana pulsada tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del tumor durante todo el experimento.

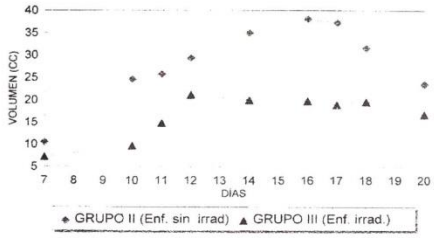

Fig. 2. Volumen del tumor vs. tiempo.

Tabla. I. Actividad antitumoral de la irradiación láser infrarroja cercana en ratas Sprague Dawley / IME portadoras del carcinosarcoma de Walker 256 durante veinte días de evolución.

GRUPOS (Número de animales)	TRATAMIENTOS	RELACIÓN MUERTAS/VIVAS EN EL DÍA 20	SOBREVIVENCIA (%)	MEDIA DEL VOLUMEN TUMORAL (CC) para todo el experimento	MEDIA DEL VALOR DE HEMATOCRITO (%) para todo el experimento
CONTROL (8 animales)	Animales sanos no irradiados	0 / 8	100	-	45
I (8 animales)	Animales sanos irradiados	0 / 8	100	-	45
II (8 animales)	Portadores del tumor transplantado no irradiados	5 / 3	37,5	28	38
III (10 animales)	Portadores del tumor transplantado irradiados	2 / 8	80	16	40

La sobrevivencia del grupo m es mayor (80%) que la sobrevivencia del grupo 11 (37,5%) al finalizar el experimento (ver Tabla I). La evaluación estadística de la sobrevivencia (Fig. 3) indica que entre el grupo II y el grupo III existe una diferencia estadísticamente significativa (p=0,03).

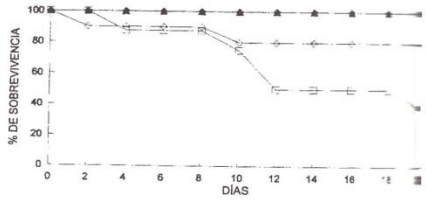

Fig. 3. Sobrevivencia vs. tiempo.

Al observar el comportamiento de las cifras de hematocrito de los grupos estudiados (Fig. 4), se puede inferir que existe un aparente ciclo biológico del mismo (considerando que las mediciones fueron realizadas a la misma hora) en los cuatro grupos de experimentación, que consiste en una disminución sostenida de sus valores a partir del primer día de medición y hasta el día octavo. En el caso de los grupos control, I y II, en este día, se presenta el valor mínimo. El decremento con respecto al valor inicial es de 4%, 3% y 15%, respectivamente En el caso del grupo m el valor mínimo de hematocrito se alcanza el día décimo de medición con un decremento del 12%, en este caso el valor mínimo del hematocrito (34%) es mayor que el del grupo II.

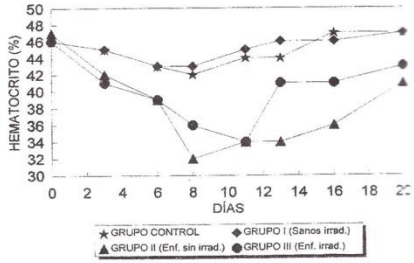

Fig. 3. Sobrevivencia vs. tiempo.

Para todos los grupos, los valores del hematocrito se incrementan a partir del mínimo hasta el final del experimento (día 20).

La evaluación de la velocidad de ascenso del hematocrito respecto al valor mínimo en los dos grupos de animales enfermos (grupos II y III). permite inferir que los animales que recibieron radiación láser presentan una recuperación del hematocrito más rápida (1,12% / día) que el grupo de animales que no recibió la irradiación (0,81% / día). Los valores obtenidos para la

velocidad de ascenso del hematocrito en los grupos de animales sanos fueron 0,45% / día y 0,36% / día para el grupo control y el grupo 1, respectivamente.

La media del valor de hematocrito (para todo el experimento) de los grupos sanos (grupos control y 1) es mayor (45%) comparada con la de los grupos enfermos (II y III), 38% y 40%, respectivamente (ver Tabla I). Esto indica que en el grupo de animales enfermos, la media del hematocrito se reduce aproximadamente en un 6% con respecto a los animales sanos.

El test de Student indica que no existen diferencias significativas entre el hematocrito del grupo control y el del grupo I ($p \Rightarrow 0,8$) y entre el grupo II y el del grupo III ($p=0,18$).

3. Discusión

La evolución del volumen tumoral promedio de los animales enfermos sin irradiar presenta un comportamiento típico en donde está presente una fase ascendente y a continuación una fase descendente, que puede ser explicada en términos de una competencia entre la capacidad proliferativa de las células neoplásicas y la eficiencia de la respuesta inmune antitumoral [18]. Los resultados obtenidos indican que la radiación láser infrarroja disminuye el volumen del tumor durante todo el experimento con respecto a los animales enfermos no irradiados. Este efecto quizás ocurra porque la radiación utilizada inhibe o estimula diferencialmente a los factores de crecimiento del tumor y a las células antitumorales del sistema inmune (CTL, NK y K) [14].

La disminución del volumen tumoral en los animales enfermos irradiados (grupo III) se traduce en un aumento de la sobrevivencia de este grupo experimental sobre el grupo de enfermos no irradiados (grupo II). Además se observó que la radiación láser no afecta la sobrevivencia de los animales sanos irradiados.

Se han observado en diversas estructuras la existencia de ritmos biológicos asociados con diferentes variables; en el caso de la sangre para diversos animales, se han medido ritmos relacionados con el hematocrito [19]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten proponer la existencia de un ciclo biológico en el hematocrito tanto de los animales sanos como de los enfermos. El período asociado al grupo de animales sanos es de 16 días, que se incrementa por efecto del tumor.

Los resultados experimentales indican que no hay efectos de la radiación utilizada sobre el hematocrito. Este hallazgo corrobora los obtenidos anteriormente por Piczek y col [20] que irradiando (632,8 nm y 904 nm) la piel de las patas traseras de ratas, no encontraron cambios significativos en la hemoglobina, hematocrito, eritrocitos o niveles de reticulocitos en sangre periférica, aún cuando encontraron un incremento de la actividad mitótica de la niedula ósea y un decremento en los mastocitos en ella, mientras que en sangre periférica encontraron un decremento de los basófilos con un incremento en el número de eosinófilos.

III. CONCLUSIONES

1. La radiación láser IR produce una disminución del volumen tumoral debido a que existe un índice tumoral superior a la unidad durante todo el experimento (entre 2,5 y 1,4) y el test de Student arrojó una diferencia significativa ($p=0,008$) entre el grupo enfermo no irradiado y el enfermo irradiado
2. La radiación láser IR incrementa la sobrevivencia en los animales enfermos irradiados (80%) cuando se compara con los enfermos no irradiados (37,5%). Adicionalmente el test de Student indicó una diferencia significativa ($p=0,03$) en la sobrevivencia de ambos grupos.
3. La radiación utilizada no tiene influencia estadísticamente significativa sobre el hematocrito, sin embargo, al evaluar la velocidad de ascenso del mismo, se observó que los animales enfermos que recibieron la radiación láser IR presentaron una recuperación del hematocrito más rápida (1,12% 1 día) que el grupo de animales enfermos que no recibió dicha irradiación (0,S1%/ día).
4. Se observó un ciclo biológico (de 16 días) en el hematocrito de los animales sanos que se incrementó en el caso de los animales enfermos. En estos últimos, la media del hematocrito para todo el experimento se reduce en un 5% con respecto a los animales sanos.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) Einstein A. (1917). Zur Quaitentheorie der Strahlung. Phyysikaliche Zeeitschrift. 18:121-128.
2) Hecht, J., Teresi, D., (1987). El rayo láser. Madrid. Salvat Editores.
3) Schewe, P. F., (1981). Lasers. The physics teacher. Nov.: 534-547.
4) Jaeglé, P. (ecl) (1986). Actas del "International colloquium in X-ray lasers", Aussois, abril 1986.

5) Artwood, D. (1992). New opportunities at soft-X-ray wavelengths. Physlcs Today. 45: 24-31

6) Wilson, B. C., Patterson, M. 5. (1986). The physics of photodynamic therapy. Phys. Med. Biol. 31: 327-360.

7) Karu, T. 1. (l987). Photobiological ñ'ndamentals of low-powcr laser therapy. IEEE Journal of Quantum Electronics. 23: 1703-1717.

8) Guluya, K., Pervaiz, S.. (1989). Elimination of clonogenic tumor cells from HL - 60, Daudi, and U-937 cell lines by laser photoradiation therapy: Implications for autologous bone marrow purging. Blood. 73: 1059-1065.

9) Mckenzie, A. L., Carruth, J. A. (1984). Lasers in surgery and medicine. Phys. Mcd. Bici, 29: 619-641.

10) Marijnissen, J. P., Verstheg, J. A., Star, W. M., Van Putten, W. L., (1992). Tumor and normal tissue response to interstitial photodynamic thcrapy of the rat R- 1 Rhabdotnyosarcoma. Y. J. Radiation Oncology. 22: 963~972.

11) Sheehan-Dare, R. A., Cotterill, J. A., (1993). Lasers in dermatology. British Journal of Dermatology. 129: 1-8.

12) Brunetaud, J. M., Decomps, B., (1982). El láser en medicina. Mundo Científico. 2:1180-1188. Diciembre.

13) Van Gemert, M. J. C., Welch, A. J., (1989). Clinical use of lager. Tissue interactions. IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. 10-13. Diciembre.

14) Tsukerman, Ya. l., Yaremenko, K V., Ibragimova, S. C., (1988). Effect of intravascular laser irradiaton of blood on growth and inetastasization of lymphosarcoma in rats. Byulleten'Ëksperímental'noi Biologii y Meditsiy. 106:472-473.

15) Nuova Elettronica (EN). 1992. Afio IX, N~ 106. Versión españoola. Noviembre.

16) Bogdankévitch, S., Daeznek, P., Elisséev, P., (1979). Les lasers á semiconducteurs MIR. Moscú.

17) Selgrad, S., (1988) Evaluación del estado físico de la rata SD/IME, receptora del carcinoma mamario de Walker 256, por medio de valores microhematocritos seriados. Jornadas científicas 50 aniversario del Instituto Nacional de Higiene.

18) Hiemaux, J. R., Lefever, R., Population dynamics of túmors attacked by inmunocompetent killer celis. En: Perelson, A. 5. (ecl). (1988). Addison-Wesley.

19) Pyczek, M., Sopala, M., Dabrowski, Z., (1994). Effect of low-energy laser power on the bone marrow of the rat, Folia-Biol-Krakow. 42 (~-4): 151~.

20) Delgado, J. M., Ritmos biológicos. En: Tresguerres, $. A. (1992). Fisiología Humana. Madrid, McGraw-Hill Interamericana.